

肝癌に対する制癌剤の経門脈的投与療法に関する基礎的研究

—肝細胞障害防止と効果増強について—

延 藤 浩

肝細胞を制癌剤による障害から保護する目的で, fructose 溶液を経門脈的に注入し, 肝エネルギーレベルを一過性に低下させる方法を考案した. 門脈内に fructose 溶液を持続注入すると, 肝細胞に特有な fructokinase によって fructose は fructose-1-phosphate に代謝され, ATP を消費して, ATP が回復するまで肝エネルギーレベルは低下した状態にとどまるため, 高濃度の制癌剤を分解する反応も低下し, 有害な中間代謝物やフリーラジカルの発生が抑制される. 40 % fructose 溶液を経門脈的に5分間注入した場合, total adenine nucleotide と energy charge は低下し, 注入終了後60分で両者は注入前値に回復し, 一過性に肝エネルギーレベルを抑制することができた. またこの際, doxorubicin を fructose 溶液と同時に投与しても, energy charge は fructose 溶液の注入終了時に 0.45 ± 0.04 に低下し, 投与終了後60分で前値に復した. ラット大腸癌の肝転移モデルに doxorubicin と fructose 溶液を併用投与した場合, 正常肝細胞は代謝が抑制されているにもかかわらず, 同時に投与した doxorubicin の抗腫瘍効果は抑制されず, GOT・GPT の測定でも, 肝細胞障害を抑制する傾向が示された. (平成2年2月19日採用)

Studies on the Treatment of Hepatic Carcinomas by Intraportal Infusion of an Anticancer Drug —Prevention of Hepatic Dysfunction and Enhancement of Anticancer Effect—

Hiroshi Nobuto

In order to protect the hepatic cells from anticancer drugs, we developed a favorable method for decreasing the hepatic energy level transiently by continuous portal administration of fructose solution. When fructose solution was administered continuously to the portal vein, it was metabolized into fructose-1-phosphate by specific fructokinase in the hepatic cells, and ATP was rapidly consumed. A reduction in the hepatic energy level was observed until recovery of ATP, and rapid detoxication of high concentrations of the anticancer drug, doxorubicin, also decreased. In addition, protection of harmful intermediate metabolites or free radicals occurring during this process was inhibited. When fructose solution was intraportally administered, total adenine nucleotides and energy charge (EC) also decreased. Both recovered to control levels at 60

川崎医科大学 消化器外科
(指導: 佐野開三教授)
〒701-01 倉敷市松島 577

Division of Gastroenterology (Director: Prof. Kaiso Sano), Department of Surgery, Kawasaki Medical School: 577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-01 Japan

minutes after the end of the administration, therefore and transient inhibition of the hepatic energy level was obtained. The decrease in EC was remained when both doxorubicin and fructose solution were infused for hepatic function. The antitumor effects of concomitant use of doxorubicin and fructose were studied using a liver metastasis model of colonic cancer in rats. The metabolism of normal hepatic cells was inhibited by the administration of fructose solution but was not inhibited by doxorubicin. The elevation of GOT and GPT on the administration of doxorubicin tended to be inhibited. (Accepted on February 19, 1990) *Kawasaki Igakkaishi* 16(1): 29-38, 1990

Key Words ① **Intraportal infusion therapy of hepatic malignances**
② **Elimination of hepatic dysfunction** ③ **Energy charge**

緒 言

今日、多発性肝癌病巣に対し選択的制癌剤投与法が多用され、かなりの効果が得られているが、一方、制癌剤による肝細胞障害を積極的に軽減防止する補助手段の開発が必要となってきた。制癌剤が肝細胞を障害する過程については、種々の機構の関与が考えられ、現在諸家により諸説が発表されている。^{1)~3)} すなわち、doxorubicin による肝細胞障害の主な原因は、doxorubicin が正常肝細胞内で代謝される過程で生じる free radicals が、膜代謝と核酸代謝に影響を与えるためとされている。^{4), 5)}

一方、肝における代謝能を検索する種々の実験が今日まで数多く行われてきた。⁶⁾ 肝における総代謝能は、エネルギーレベルに平行して変化し、低エネルギーレベルでは解毒反応も含め代謝が低下すると思われる。in vitro において肝組織、遊離肝細胞を 5~10 mM の濃度の fructose 溶液で灌流すると、adenosine triphosphate (ATP と略す)、total adenine nucleotide は大きく低下することが知られている。またこの際、門脈内に fructose 溶液を注入すると、全身性に fructose 溶液を投与する濃度より低濃度で肝エネルギーレベルを低下させることが示され、他臓器への fructose 溶液の影響を最小限にとどめうる事が報告されている。⁷⁾

これらの事実から、fructose 溶液を経門脈的に注入し、正常肝細胞の代謝能を一過性に抑

制して、肝での制癌剤の代謝から生じる free radicals を減少させ、肝細胞障害を防止する手段を考案した。この際、肝代謝の抑制は一過性でなければならないため、経門脈的に注入する fructose 溶液の濃度や投与時間をかえ、肝エネルギーレベルを測定して最良の濃度と注入時間を決定した。また、fructose 溶液を同時に注入したときの doxorubicin の肝癌に対する抗腫瘍効果、並びに GOT・GPT を測定して肝細胞障害防止効果についても検討した。

実験材料と方法

I. 実験材料

体重 200g 前後の雄性 Sprague-Dowley rat (以下ラット) を、以下の実験に使用した。

1. 肝 total adenine nucleotide, energy charge (以下 EC と略す) の測定の実験に、2 週間固形飼料と水道水で飼育後、正常な体重増加を示すものを使用した。

2. 肝細胞遊離培養による形態学的変化の実験に、市原らの方法⁸⁾ により、0.05% collagenase (Sigma 社製 Type 1) 溶液にて肝を灌流後、遊離肝細胞浮遊液を調整、60 × g 低速遠沈 3 回を行って肝実質細胞を分離し、Type 1 collagen (Sigma 社製) 処理したカバーグラスをプラスチックシャーレに置きガス滅菌し、これに 1×10^5 cell/0.2 ml/cm² の条件で遊離肝細胞を播き、5% 牛胎児血清、 10^{-8} M dexamethasone、100 μ /ml penicillin、10 μ g/l

streptomycin を含む Williams E 培地 (Sigma 社製) を用いて, CO₂-インキュベーター中で培養し, 培養 6 時間後, 同様の培地にて液交換し, 培養 24 時間後には, dexamethasone を除いた培養液に交換し, 培養開始後 48 時間経過したものを実験に使用した. 培養開始後 1 時間以内に, ほとんどの肝実質細胞は dish 面に接着, 接着後 6~7 時間で spreading を完了し, 核が鮮明に観察できた. その後, 細胞間接着が強固となり, 培養 1 日後には, 培養肝細胞は美しい monolayer を形成し, 成熟肝細胞の特徴である binuclear cell も観察されるようになり, 無処置のものでは 1 週間までは良好な状態で維持することができた.

3. doxorubicin の抗腫瘍効果の実験に, ラット大腸癌の肝転移モデルを下記の方法で作製して使用した.

(a) ラット大腸癌の作製

MNNG (n-methyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine) を 0.5 ml (2.5 mg/kg) を 16 日間直腸内に注入し, つづいて DMH (1, 2-dimethylhydrazine) を皮下に週 1 回 20 mg/kg を 16 週投与して作製した.^{9), 10)} 薬剤投与開始後 30~35 週の時点で 40 匹について組織学的に検討した (Table 1). 10 mm 以上の腫瘍径のものは,

Table 1. Carcinomas of the 40 rats intestine, induced by combination of 1,2-dimethylhydrazine and n-methyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine. (Cancer was induced in 40 of 40 rats.) The incidence being 100%. (6.7 cancers were observed per a tumor bearing rats.)

(mm)	dysplasia			cancer
	mild	moderate	severe	
0~1.9	19	12	8	12
2~3.9	1	2	14	25
4~5.9	—	1	9	32
6~7.9	—	2	7	33
8~9.9	—	—	1	46
10~	—	—	—	44
total	20	17	39	192

すべて組織学的に cancer と判定することができた.

(b) ラット大腸癌の肝転移モデルの作製

作製した担癌ラットを開腹して直径 10 mm 以上の癌腫を摘出し, その 1/2 を dispase にて浮遊細胞とし, 腸間膜の末梢静脈より 2×10^5 個を注入し作製した. 残った腫瘍は, hematoxylin-eosine 染色し, cancer であることを確認した.

4. 肝細胞障害の防止効果の実験に, 2 週間固形飼料と水道水で飼育後, 正常な体重増加を示すものを使用した.

II. 実験方法

1. total adenine nucleotide と EC の測定方法

pentobarbital sodium 50 mg/kg による麻酔後, 保温手術台上に仰臥位で固定し, 体温低下による EC の低下を防止した. ラットの下腹部に小切開を加え小腸末端を露出し, 腸間膜静脈末梢に 24 G のジェルコ IV カテーテル (CRITIKON 社製) を挿入し, 持続注入ポンプを用いて fructose 溶液を持続注入した. 注入終了後, 切開創を上方に拡大して肝臓を露出し, 液体窒素で冷却した 2 個の金属片で肝臓を挟むように凍結した. 凍結後, 切除した肝臓 1 g に対し, 2 ml の 0.5 N 過塩素酸を加えて除蛋白し, 低温で homogenize した後に, ベーリンガー・マンハイム社製測定キットを使用して, 上清の ATP・ADP・AMP を測定し EC を次の式で算出した.

$$EC = (ATP + 0.5ADP) / (ATP + ADP + AMP)^{(11), (12)}$$

なお, total adenine nucleotide と EC の変化の比較は, 次の条件で測定し検索した.

(a) 10%, 20%, 40% fructose 溶液, 20% glucose 溶液の 4 種類を, 門脈または尾静脈から 15 分間持続注入し, 注入直後に測定した.

(b) 20%, 40% fructose 溶液を 15 分間経門脈的に注入し, 注入開始後 5, 15, 30, 60

分で測定した。

(c) 40% fructose 溶液を15分間持続注入し、注入直後、5、15、30、60分で測定した。

(d) doxorubicin 1mg/kg または 10mg/kg を 40% fructose 溶液の門脈内5分間持続注入の直後に投与し、投与後5、15、30、60分で測定した。

2. 初代遊離肝細胞培養における形態学的変化の観察方法

培養開始後48時間経過したものを、doxorubicin 1 μ g/ml になるように付加した培養液で10分間培養した場合と、fructose 溶液を5mM/ml になるように付加した培地で5分間培養した後、doxorubicin 1 μ g/ml を含んだ培地にて10分間培養した場合について、hematoxylin-eosin 染色を行って光顕的にそれらの形態を比較観察した。

3. fructose 溶液を前注入した場合の doxorubicin の抗腫瘍効果の判定方法

ラット大腸癌の肝転移モデルに doxorubicin (1mg/kg) を4日目と14日目に経門脈的に投与し、28日目に転移巣の数と長径を測定し比較検討した。また、ラット大腸癌浮遊細胞を門脈内に注入後4日目に、fructose 溶液の5分間持続注入を行い、28日目の転移巣の数と長径についても比較検討した。転移病巣は、各々の実験終了時に組織標本を作り、病理学的に転移を確認した。

4. 40% fructose 溶液前注入による肝細胞障害の防止効果の判定方法

doxorubicin (1mg/kg) を単独投与したラット、40% fructose 溶液5分間持続注入中に doxorubicin (1mg/kg) を同時投与したラット、40% fructose 溶液を doxorubicin (1mg/kg) 投与の直前に5分間持続注入したラット、各々40匹について投与1時間後、6時間後、

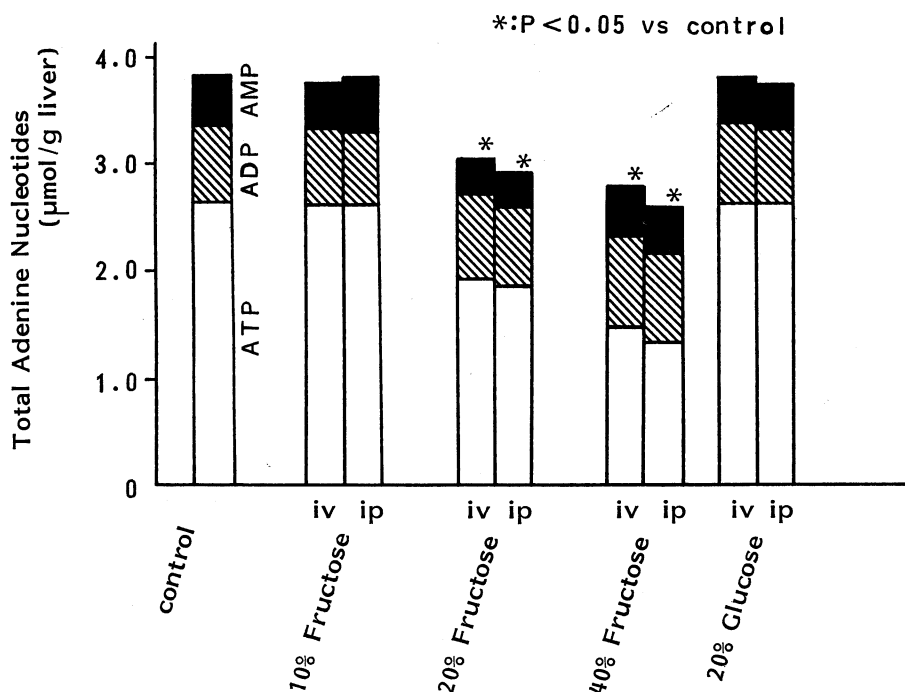


Fig. 1. Total adenine nucleotides at the peripheral vein infusion (iv) and intra-portal infusion (ip) of 10%, 20% and 40% fructose solutions in rats. (mean level in 10 rats)

24時間後, 72時間後に尾静脈より採血し GOT・GPT を測定した。

5. 統計処理

統計学的分析は, 分散分析によって実験群間に有意差があるものにつき, modified t-test をもちいて2群間の有意差を決定した。

実験結果

1. 肝細胞の total adenine nucleotide と EC の測定結果

(a) glucose 溶液, fructose 溶液の尾静脈

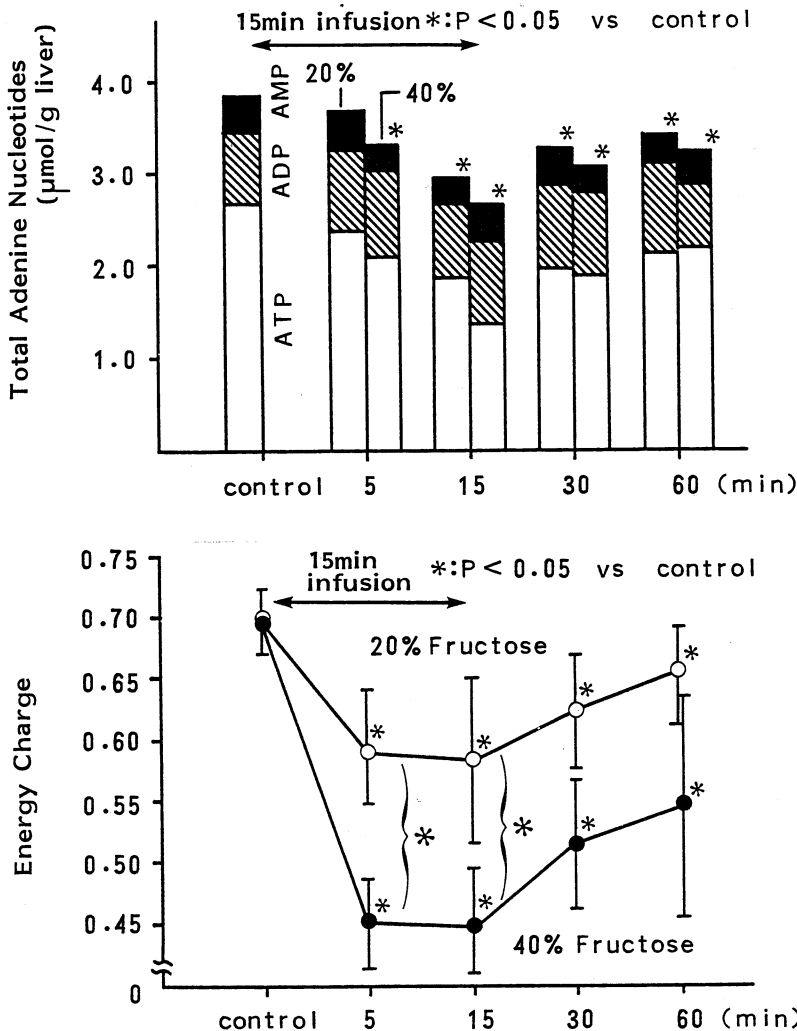


Fig. 2. Total adenine nucleotides and energy charge (EC) at the intraportal infusion of 20% and 40% fructose solutions for 15 minutes. (in 40 rats) (continuous infusion for 15 minutes)

内または門脈内への15分間の持続注入終了時の total adenine nucleotide と EC

無処置ラット(以下control群)における肝細胞の total adenine nucleotide は 3.9 ± 0.21 で, EC は 0.71 ± 0.03 であった. 10% fructose, 20% glucose 溶液の静脈内, 門脈内注入では, total adenine nucleotide と EC は, control 群と同様な値を示し, 肝エネルギーレベルの低下はなかった. 20%, 40% fructose 溶液の静脈内または門脈内注入では, control 群に比べ ATP の減少と ADP の増加で有意な差を示し,

EC も同様に control 群に比べ20%, 40% fructose 溶液ともに有意に低下した. 門脈内注入は静脈内注入に比べ ATP の減少, ADP の増加, EC の低下が高度となる傾向を示したが有意差はなかった (Fig. 1).

(b) 20%, 40% fructose 溶液の15分間経門脈的持続注入による total adenine nucleotide と EC の経時的变化

20%, 40% fructose 溶液を15分間注入したときの total adenine nucleotide と EC は, fructose 溶液を注入開始後15分までしだいに低下し, 注入終了後15分, 45分でも20%, 40% fructose 溶液ともに, control 群に比べ有意に減少していた.

total adenine nucleotide の経時的变化では, 20%, 40% fructose 溶液ともに注入終了15分, 45分で ATP

の減少, ADP の増加が control 群に比べ有意であった。しかし, 20%と40% fructose 溶液間では, total adenine nucleotide に有意差はなかった。EC の経時的变化では, 20%, 40% fructose 溶液とともに control 群に比べ5分で有意に低下し, 20% fructose 溶液で 0.59 ± 0.049 , 40% fructose 溶液で 0.45 ± 0.038 となった。注入終了時(15分値)でも, 20% fructose 溶液で 0.58 ± 0.071 , 40% fructose 溶液で 0.43 ± 0.057 に低下し, fructose 溶液を持続投与している5分から15分の間は, 20%, 40% fructose 溶液の肝エネルギー

ギーレベルの低下にも有意差を示し, 中でも40% fructose 溶液のほうがより有意であった。しかし, EC は注入終了後60分になっても20% fructose 溶液で 0.66 ± 0.047 , 40% fructose 溶液で 0.55 ± 0.097 とともに有意に低下しており, control 群の値までは回復しなかった (Fig. 2)。

(c) 5分間と15分間の40% fructose 溶液持続注入による total adenine nucleotide と EC の経時的变化の差異

5分間の持続注入の場合, EC の低下は注入終了5分後には 0.52 ± 0.071 まで回復し, 60分

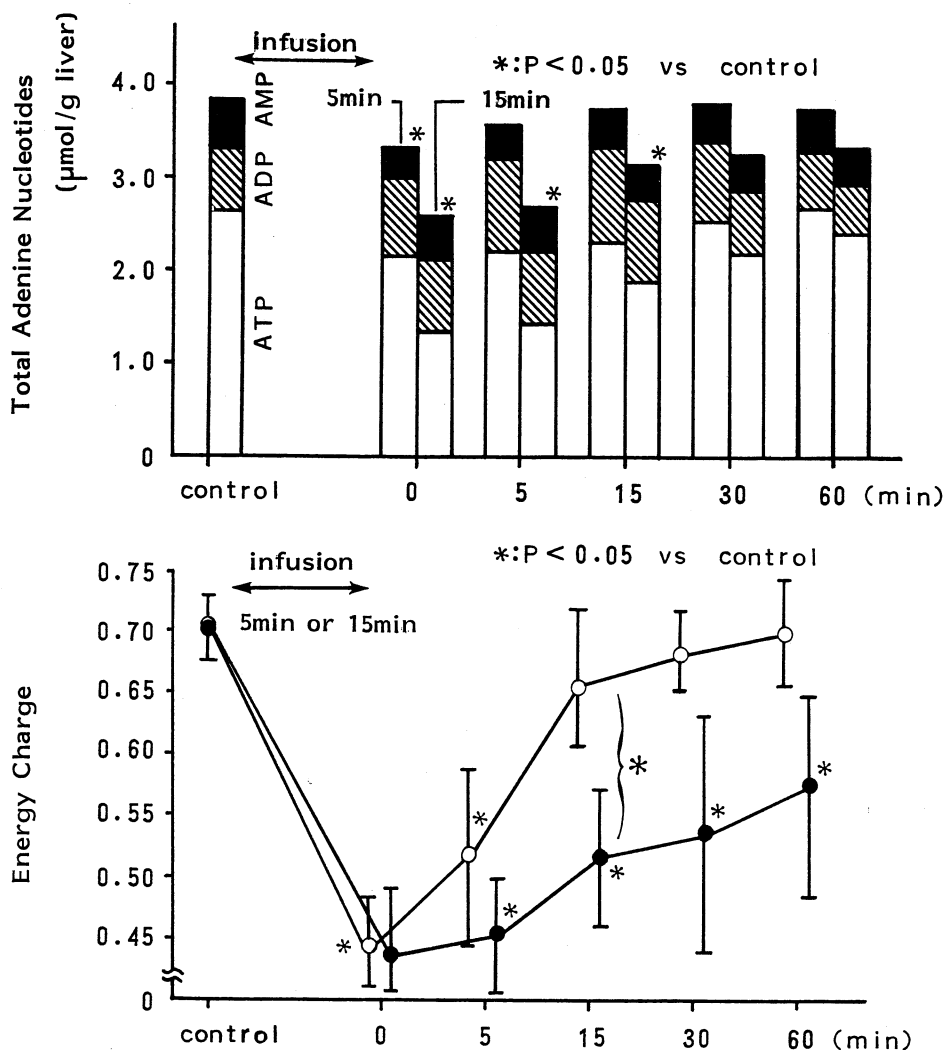


Fig. 3. Chronological changes of total adenine nucleotides and EC at the intraportal infusion of 40% fructose solution for 5 minutes (○) or 15 minutes (●).

後には control 値まで回復した。なお、5 分と 15 分の持続注入間では、注入終了 15 分後に有意差を示した。肝エネルギーレベルを十分に低下させ、さらに低下が一過性に止まる fructose 溶液の濃度は 40 % の場合が最適で、注入時間は 5 分が最良であることが判明した (Fig. 3)。

(d) doxorubicin 1 mg/kg または 10 mg/kg と経門脈的 40% fructose 溶液との、経門脈的持続注入終了時における total adenine

nucleotide と EC の変化

doxorubicin の濃度が 1 mg/kg でも 10 mg/kg の場合でも、40 % fructose 溶液の単独注入の場合の変化と同様で、doxorubicin の投与によっては、total adenine nucleotide と EC への変化はみられなかった (Fig. 4)。

2. fructose 溶液の前付加の有無による doxorubicin の培養細胞に与える形態学的変化の差

doxorubicin 1 μ g/ml を付加した培養液にて

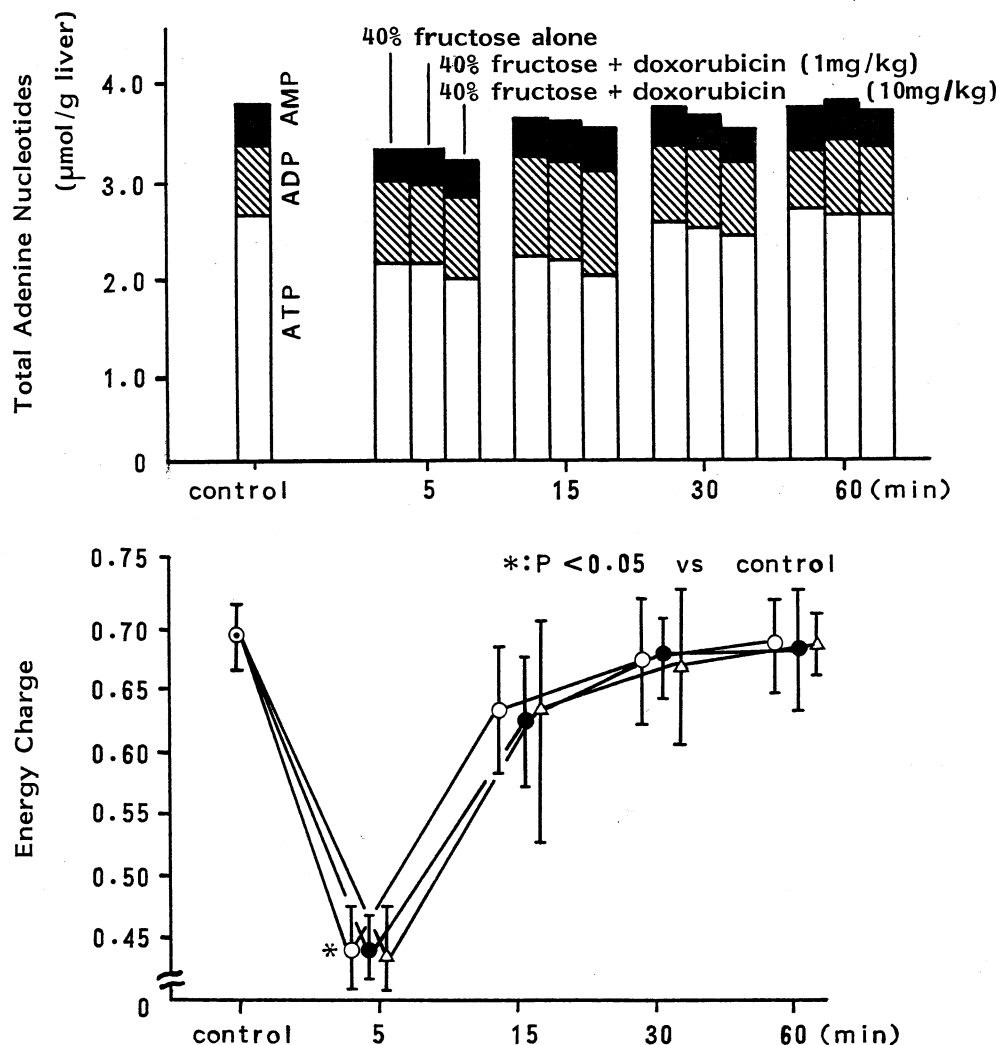


Fig. 4. Total adenine nucleotides and EC were chronologically measured in cases infused intraportally 40% fructose solution alone (\bigcirc - \bigcirc), 40% fructose and doxorubicin solutions (1 mg/kg) concomitantly (\bullet - \bullet), and 40% fructose and doxorubicin solutions (10 mg/kg) concomitantly (\triangle - \triangle).

10分間培養したものでは、約60%の肝細胞の表面に膜代謝障害による細胞膜の膨隆 (blebbing) が出現した。しかし、前もって fructose 溶液 5 mM/ml を含んだ培養液で5分間培養したものでは、blebbing が出現した肝細胞は約25%に減少した。

3. fructose 溶液を前注入した場合の doxorubicin の抗腫瘍効果

大腸癌浮遊細胞注入後28日目の転移巣の発生数と長径をみると、無処置群では、発生数は4.7個(3~7個)で、長径は4.0mm(2.8~8.0mm)であったのに対し、doxorubicin (1 mg/kg) を4日目に投与した群では、転移巣の数、長径ともに減少した。しかし、doxorubicin を14日目に投与した群では、無処置群とほぼ同様の転移数、直径を示した。4日目に40% fructose 溶液を5分間持続注入し、その直後に doxorubicin を投与した群では、28日目の転移数1.8個、直径1.8mmであった (Table 2)。

4. GOT・GPT の測定結果

20% glucose, 40% fructose 溶液注入時の経時的変化の検索では、GOT・GPT ともに軽

度の上昇を示すものもあったが、平均値では対照と著変はなかった。doxorubicin (1 mg/kg) の単独投与では、GOT・GPT が投与後1時間目より上昇傾向を示した。doxorubicin の単独投与、および40% fructose 溶液持続注入中に doxorubicin を投与したラットでは、1時間後に GOT が150 U/dl, GPT が70 U/dl を超えるものがみられた。doxorubicin 投与直前に40% fructose 溶液を経門脈的に5分間持続注入した群でも、GOT・GPT の軽度の上昇はみられたが高値を示すラットの数はいなかった。有意差には至らなかったが、doxorubicin 投与前 fructose 溶液の経門脈的持続注入は、肝細胞障害に対する抑制効果のあることが判明した (Fig. 5)。

Table 2. The number and diameter of the metastatic foci at the 14th and 28th days after intraportal infusion of free cells (2×10^5) of colonic cancer of rats are shown.

Group	14 th day		28 th day	
	number	diameter (mm)	number	diameter (mm)
A	4.0(3~7)	2.3	4.7(3~7)	4.0
B	1.2(0~3)	1.3	2.1(0~5)	2.2
C	—	—	4.9(2~8)	4.1
D	1.1(0~3)	1.4	1.8(0~4)	1.8

Group A: non-treated. Group B: intraportal infusion of doxorubicin (1 mg/kg) on the 4th day after infusion of free cells. Group C: intraportal infusion of doxorubicin on the 14th day. Group D: intraportal infusion of 40% fructose solution on the 4th day for 5 minutes, immediately after intraportal infusion of doxorubicin.

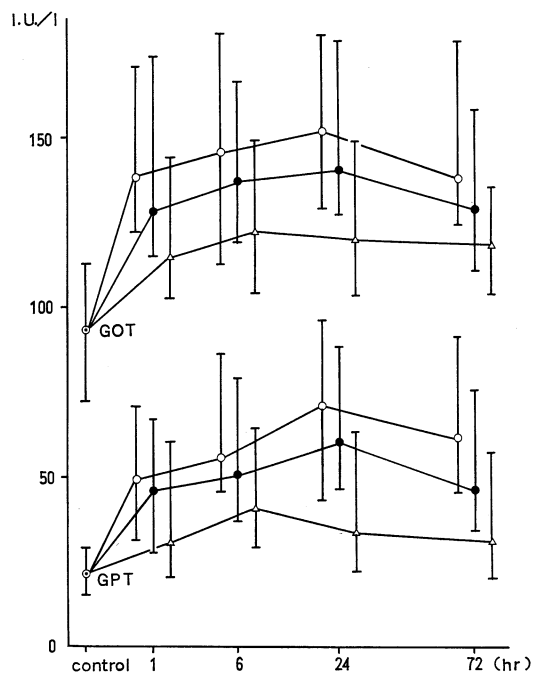


Fig. 5. GOT and GPT 40 rats

○—○: Cases of the intraportal infusion of doxorubicin (1 mg/kg).

●—●: Cases infused doxorubicin (1 mg/kg) during continuous intraportal infusion of 40% fructose solution for 5 minutes.

△—△: Cases infused doxorubicin (1 mg/kg) immediately after intraportal infusion of 40% fructose solution for 5 minutes.

考 察

肝癌、特に切除不能の多発性肝細胞癌や転移性肝癌の治療には、制癌剤の選択的投与がある程度の成果を挙げているが、薬剤による肝細胞障害も軽視できない。なお、薬剤性肝細胞障害の発生機序については、解明されつつあり、制癌剤は、代謝される過程で、生物の本来の意にそぐわぬ細胞毒性や発癌性をあらわす活性中間代謝産物を生じるためと考えられている。代謝物としては、薬剤自体が酸化・還元反応を受けてできる有機カチオンあるいは有機フリーラジカルと、これらと密接な相互関係を有するいわゆる活性酸素群があり、細胞毒性の発現は、活性中間体と組織の不飽和脂肪酸や蛋白質との共有結合に端を発す。現在、フリーラジカルが薬剤の毒性発現に決定的な役割を演じているという証拠が集積されつつある。今回使用したdoxorubicinによる肝細胞障害は、P-450還元酵素 (fp 2) が関与した反応の過程で発生するフリーラジカルにより惹起されと考えられている。^{13), 14)} この解毒反応は、エネルギー伝達物質であるATPを消費する反応である。そこで、肝細胞内のATPのみを制癌剤投与前に低下させておくことにより、制癌剤の中間代謝物、フリーラジカルの発生を抑制し、肝細胞障害の発生を軽減できるものと考えた。今回の実験で、経門脈的に注入した40% fructose溶液の門脈内血中濃度は、正常ラットの心拍出量を約250 ml/min/kg^{15), 16)}とし、その約40%が門脈内に流入するとの報告から算出すると、3.7 mMになる。この濃度は、他の灌流実験の濃度に比べ比較的低い濃度であるが、40% fructose溶液の15分間持続注入により肝ECは約60%までに低下し、Clarkら¹⁷⁾が肝細胞のECを65%減少させたという報告とよく一致する。また、fructose溶液を腸間膜の静脈に注入すると、注入したfructose溶液は静脈血流に異常が無い場合には門脈に集まり、全量が肝に達する。

肝においては、肝細胞特有のfructokinaseがATPを消費してfructoseをfructose-1-

phosphateに磷酸化する反応が、glucoseをglucose-1-phosphateに磷酸化する反応に比べより急速に進行し、ミトコンドリア内膜の電子伝達系(呼吸鎖)のうちNADH脱水素酵素、還元型CoQ、還元型チトクロームCの部位で行われるADPをATPに回復させる反応を上回る結果となり、5分間のfructose溶液の注入終了後には、急速にATPの回復が起こる。しかし、fructose溶液の持続注入が、15分を超えるように長いと、ミトコンドリアの呼吸鎖にも影響を与えるようになり、ADPをATPにする反応も回復がおくれて、肝エネルギーレベルの恒常性に破綻をきたして永久的な障害、ひいては肝細胞の死を招く結果となる。40% fructose溶液の5分間の持続注入による肝エネルギーレベルの操作では、注入終了後には肝エネルギーレベルの低下は回復し、肝細胞の代謝は正常化する。また、fructose溶液の注入により肝細胞の代謝は低下するが、高濃度のdoxorubicinが肝細胞内に存在しても、肝エネルギーレベルには影響がなく、その上、解毒反応も低下しているためフリーラジカルの発生も抑制される。この結果、doxorubicin投与直前に40% fructose溶液を5分間、経門脈的に持続注入したラットでは、GOT・GPTの上昇を軽減することができたものと考えられる。ここで問題となるのは、ラットにおけるGOT・GPTの上昇はどの程度肝細胞障害と併行して出現するかである。doxorubicinを単独で投与したもの、40% fructose溶液を前注入したもので、各々40匹について経時的に測定した結果、GOT・GPTの上昇を示すものは単独投与で32.5%、40% fructose溶液の前投与でも30%に認めた。しかし、40% fructose溶液を前注入したものの経時的測定結果では、GOTが150 U/dlを、また、GPTが70 U/dlを超えるラットはいなかった。さらに、初代遊離肝細胞培養による形態学的検索でも、fructose溶液を使用するとdoxorubicinを単独で使用したときと比較して、細胞の形態学的変化は少なく、40% fructose溶液の前注入は、肝細胞

胞障害の防止に有用であると思われた。doxorubicin の抗腫瘍効果は、fructose 溶液の注入によっても減弱することはなかった。このことにより、fructose 溶液の注入が正常肝細胞と腫瘍細胞の代謝に、明らかな較差を生じせしめたものと思われる。

稿を終えるにあたりご指導、ご校閲いただいた川崎医科大学消化器外科教室 佐野開三教授に深く感謝いたします。また、終始有益な助言と協力をいただいた各センター及び当教室の諸兄に感謝いたします。

文 献

- 1) 佐々木博, 市原文弘, 井上恭一: 薬剤性肝障害の形態. 山本祐夫編: 薬剤性肝障害の臨床. 東京, 金原出版. 1976, pp. 145—170
- 2) Judith, K. and Jones, M. D.: Suspected drug induced hepatic reactions reported to the FAD's adverse reaction system. *Semin. Liver Dis.* 1: 157—167, 1981
- 3) Kaplowitz, N. and Tak Yee, A. W.: Drug induced hepatotoxicity. UCLA conference. *Ann. Intern. Med.* 104: 826—839, 1986
- 4) Halliwell, B. and Gutteridge, J.: Free radicals in biology and medicine. New York, Oxford University Press. 1985
- 5) Mason, R. P.: Monograph on free radical metabolites of toxic chemicals. *Environ. Health Perspect.* 64: 1—342, 1985
- 6) Atkinson, D. E.: Enzymes as control element in metabolic regulation. In *The Enzymes*, ed. by Boyer, P. D. New York, Academic Press. 1970, pp. 461—489
- 7) Smith, C. M., Rovano, L. M. and Raivio, K. O.: Fructose induced adenine nucleotide catabolism in isolated rat hepatocytes. *Can. J. Biochem.* 55: 1237—1240, 1977
- 8) 中村敏一, 青山和司, 市原 明: 分離肝細胞の調整と初代培養法. 蛋・核・酵 別冊: 55—76, 1981
- 9) Thurnherr, N., Deschner, E. E. and Lipkin, M.: Induction of adenocarcinoma of the colon in mice by weekly injection of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res.* 33: 940—945, 1973
- 10) 安富正幸: 1,2-dimethylhydrazine と n-methyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine の併用によるラット実験腸発癌. *J. Jpn. Soc. Cancer Ther.* 21: 978—984, 1986
- 11) Lmaprecht, W. and Trautschold, I.: Adenosine-5'-triphosphate determination with hexokinase in glucose-6'-phosphate: Dehydrogenase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. by Bergmeyer H. U. New York, Academic Press. 1974, pp. 2101—2109
- 12) Manno, M., De Matteris, F. and King, L. J.: The mechanism of the suicidal, reductive in activation of microsomal cytochrome P-450 by carbon tetrachloride. *Biochem. Pharmacol.* 37: 1981—1990, 1988
- 13) 小田浩司: 小胞体とフリーラジカル. 肝・胆・脾 19: 783—793, 1989
- 14) Sato, T., Tanaka, J., Cottrell, J. R., Cowley, R. A. and Trump, B. F.: Comparison of systemic hemodynamic response in the rat following a sonicated, heat-killed, and live E. Coli injection. In *Advances in Shock Research*, Vol. 9 ed. by Reichard, S. M. and Wolfe, R. R. New York, Alan R. Liss. 1983, pp. 115—123
- 15) Sato, T., Hirai, F., Nakatani, T. Berezsky, I. K. and Trump, B. F.: Direct measurement of hepatic blood flow in rats using the thirmodilution method. *Circ. Shock* 13: 103, 1984
- 16) Clark, D. G., Filsell, O. H. and Topping, D. L.: Effects of fructose concentration on carbohydrate metabolism, heat production and substrate cycling in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 184: 501—507, 1979